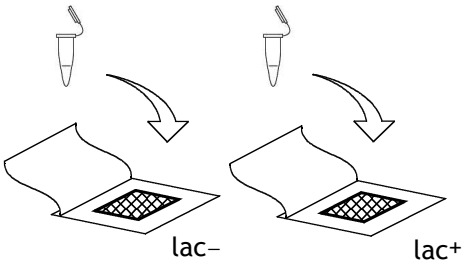
2014/06/20

JNC株式会社　シート培地「サニ太くん」を用いておこなう
「大腸菌ラクトースオペロンにおける遺伝子の発現調節」を確かめる高校「生物」生徒実験

１．推奨する実験の内容（基本の実験）

① IPTGによるラクトースオペロンの誘導を確認する

大腸菌懸濁液の 10 倍希釈列を作り、
lac−（IPTG −）・lac+（IPTG ＋）それぞれの
シートに（予備実験で決めた）２段階の濃度
から、それぞれ１ mL ずつ滴下し、
24 時間後にコロニーの様子を観察記録する。



IPTG（−）　IPTG（＋）

lac−（IPTG −）シート２枚・lac+（IPTG ＋）シート２枚 ポリスポイト１本　マイクロチューブ８本 PBS（市販のミネラル水でも可） 9mL

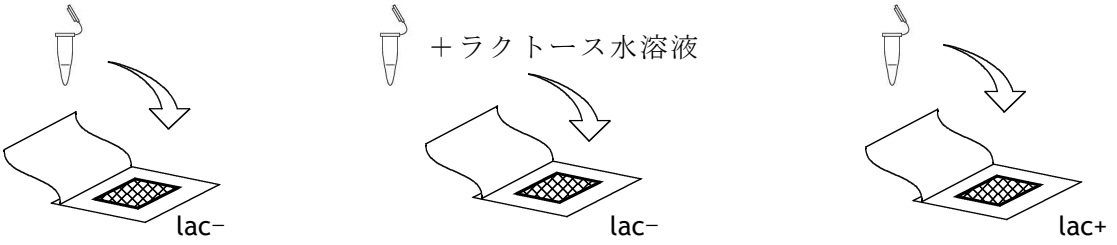
× 班数 ＋ 教師予備実験用

＋

スタートシート（大腸菌を培養したサニ太くん）　つまようじ 容器入り釣菌用 PBS（ミネラル水でも可）9mL

② IPTGおよびラクトースによるラクトースオペロンの誘導を確認、比較する

大腸菌懸濁液の 10 倍希釈列を作り、希釈液そのまま、希釈液にラクトース水溶液を
加えたもの、それぞれを２段階の濃度から lac−（IPTG −）のシートに滴下する。
また、、希釈液そのままを２段階の濃度から lac+（IPTG ＋）のシートに滴下する。
24 時間後にコロニーの様子を観察記録する。



IPTG（−）　IPTG（−）　IPTG（＋）

lac−（IPTG −）シート４枚・lac+（IPTG ＋）シート２枚 ポリスポイト２本　マイクロチューブ 10 本 PBS（市販のミネラル水でも可） 9mL 5%ラクトース水溶液　1mL

× 班数 ＋ 教師予備実験用

＋

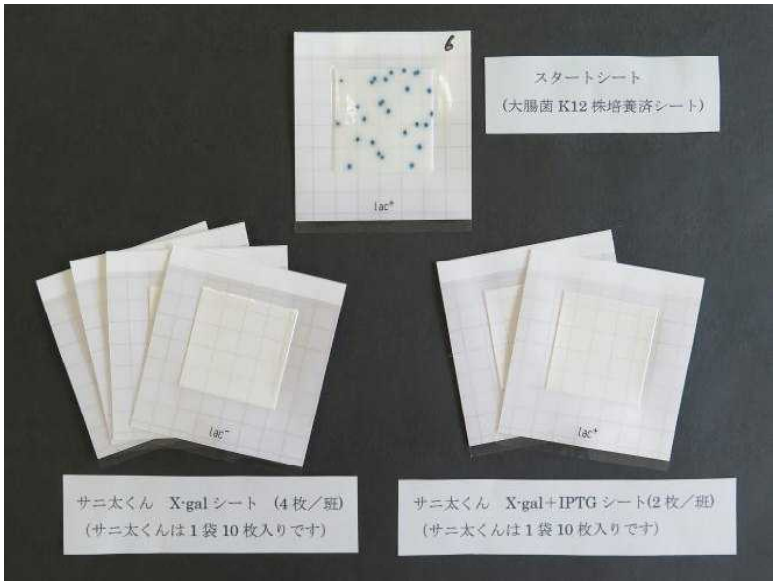
スタートシート（大腸菌を培養したサニ太くん）　つまようじ 容器入り釣菌用 PBS（ミネラル水でも可）9mL

2．モニター品　申し込み方法

サニ太くん高校生物教材用は当面、モニター期間として、JNC 株式会社より無償で提供していただくことができます。
ご利用の際には、今後のために**必ず「モニターアンケート」にご協力くださいますよう**にお願いいたします。
（本書末尾に付けています。）

サニ太くんは 10 枚 1 袋です。サニ太くん２種類を必要袋数と、スタートシート（大腸菌 K12 株を培養した釣菌用のシート）の希望の有無をお知らせいただくことになります。

基本の実験②の場合



1 班に lac−(X-gal 含む）4枚　lac+(X-gal＋IPTG含む）2枚
他に、教師予備実験用に数枚が必要です。

なお、安全のため、スタートシートをご利用の場合には誓約書の返送をお願いしています。

申し込みフォームを用いて、JNC 株式会社（下記）宛に Email か FAX で申し込んで下さい。

FAX：**(03)3243-6219**　　Email：sanita-kun@jnc-corp.co.jp

3．実施校で準備していただくもの

- 釣菌用つまようじ（滅菌できればベター）
- ５％ラクトース水溶液
- 消毒用 70 %エタノール（スプレー）
- 希釈用 PBS（市販のミネラルウォーターで十分）
- 小分け用容器（10mL　班数＋釣菌用 1 本）
- マイクロチューブ（スクリュー瓶などでも可）
- 1mL ポリスポイト（目盛り付き）　2 本／班
  （あればマイクロピペットがベター）

その他
35 ℃保温できるインキュベーター　　チューブ立て　　油性ペン　石けん　ペーパータオル

※希釈用滅菌水（PBS）について

市販のミネラルウォーターはほぼ無菌なので､きれいな小分け容器が用意できるのであれば､市販の水で十分です。15mL の遠沈管があれば使えますし、ガラスのスクリューびんなどを煮沸、あるいは、塩素系漂白剤の液に浸すなどして、小分けビンに使えばコンタミの心配はほとんどありません。食塩水にする必要もありません。

9mL の小分け容器の希釈用 PBS がネット販売で出回っています。1 つ 40 数円は高いですが、容量も実験にピッタリなので、分注や滅菌の手間を考えると、使う手もあるように思います。

コンタクトレンズ用の精製水や生理食塩水がありますが、抗菌剤が入っていることがあるため、微生物の培養には不向きです。

※ポリスポイト

マイクロピペットを持っている学校であれば、マイクロピペットの方が正確で、チップの始末も簡単です。

1mL ポリスポイトはγ線滅菌、個包装のものも出ていますが、無滅菌のものでも支障なく使えています。目盛りのあるものが必要です。100 本で 1000 ～ 1400 円程度です。

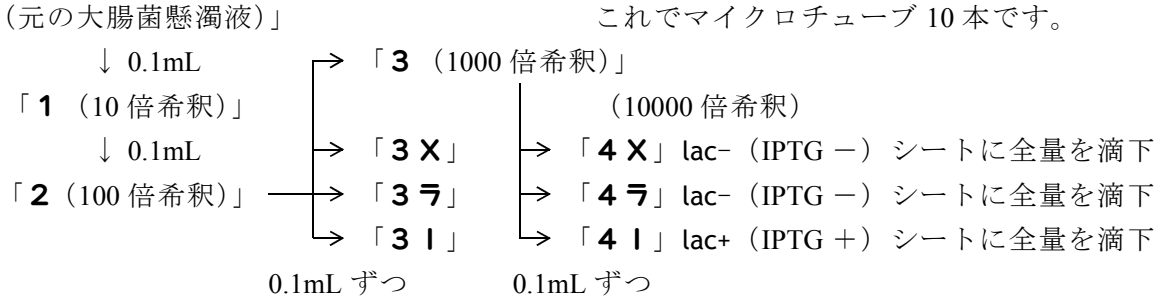
サニ太くんは滴下液量が 0.9mL を下回ると、コロニーが極端に小さくなる、コロニーが出ないなどの、支障が出てきます。ポリスポイトの目盛りは正確ではないことも多く、1mL の目盛りまで吸っても 0.9mL に達していない場合や、0.1mL の目盛りで 0.2mL 近く吸ってしまう場合もあります。前もって、目盛りと量の確認を行い、滴下量が少なくなってしまわないように実験操作の指示をすることが必要です。

※ラクトース水溶液

5 %の水溶液を配布します。チューブの PBS から 0.1mL を吸い出し、代わりにラクトース水溶液を 0.1mL 入れて、滴下時の濃度を 0.5 %にします。これより濃度が高くなると、大腸菌の生育に支障が出ることがあります。

※ 10 倍希釈列について

予備実験で 1000 倍希釈、10000 倍希釈を用いることに決めた場合、生徒実験では次のようにしています。「**０**（ゼロ）」以外のチューブにすべて希釈用溶液を 0.9mL ずつ入れておき、ラクトース添加のチューブ（「**３ラ**」「**４ラ**」）は先に上記の方法でラクトース液にしておきます。



※後始末について

実験後のサニ太くんは直接鍋に入れて煮沸して廃棄することができます。

４．高校生物実験のための「サニ太くん」発色のしくみ・取り扱いについて

シート培地「サニ太くん」は「JNC 株式会社」が製造する、食品・環境中の微生物検査用シート状培地です。薄い不織布を貼り付けた培地フィルムを防水シートと透明シートで挟んであり、一般生菌用、大腸菌群用、サルモネラ菌用など、いろいろな種類があります。

「サニ太くん 高校生物実験教材用」のシートは、TTC（脱水素酵素のはたらきにより還元されると赤色になる）が含まれている一般生菌用のシートをベースに、ラクトースオペロンの ON ／ OFF を観察できるように特別に作っていただいたもので、

① X-gal を含み、IPTG を含まない（IPTG －）シート…シート下部に lac−と表示
② X-gal と IPTG を含む（IPTG ＋）シート…シート下部に lac+と表示　　の２種類です。

どちらのシートにも TTC が含まれているため、菌が生育してコロニーを作れば、菌の呼吸によって赤色の発色が起こります。

これに、菌がβ-ガラクトシダーゼを合成して、X-gal の分解による青色の発色が加わると、コロニーが青紫色～青色になります。IPTG はラクトースオペロンの発現を強く誘導します。

※今回、提供するサニ太くんは lac−のシートがやや青みを帯びたコロニーになる場合があります。これは、通常の K12 株ではラクトースや IPTG を加えていなくても、非常に弱くではありますが、ラクトースオペロンの発現があるからです。

特に、実験後、シートを冷蔵庫に保管すると、大腸菌の活動が弱まり、呼吸による赤色の発色が進まない一方、酵素による X-gal の分解は起こるため、次第に青みが出てきます。また、X-gal の発色に酸素を使うため、閉じる際に空気を入れてしまうと、より青みが出てしまうようです。透明カバーと内部の培地部分を密着させるように、カバーをゆっくり閉じて下さい。

サニ太くんの扱い方については　ＪＮＣ株式会社のサニ太くんのサイトに詳しく出ています。
http://www.jnc-corp.co.jp/sanita/
試料の滴下のしかた、後始末のしかた、釣菌の方法など、とても詳しく出ていますので、
実験前に読んでおくことをお勧めします。

サニ太くん　取扱説明書
http://www.jnc-corp.co.jp/sanita/pdf/torisetsu.pdf

サニ太くん　試料液添加方法
http://www.jnc-corp.co.jp/sanita/pdf/shiryoueki_tenka.pdf

兵庫県立須磨東高等学校のホームページ「須磨東 理科 実験教材の広場」には
実験手順の詳細、発展的な実験の例、生徒実験の様子や関連の資料を掲載しています。
http://www.hyogo-c.ed.jp/~sumahigashi-hs/

「サニ太くん高校生物実験教材用」は、高等学校の生物実験のために、JNC 株式会社にお願いして、特別に作っていただいているもので、一般には市販されていません。
現在、モニター品段階ですので、本実験に関するお問い合わせは 須磨東高等学校 薄井までお願いいたします。

須磨東高等学校　　電話　078-793-1616

実験結果例

lac− X-gal（IPTGなし） ラクトースオペロンはOFF	lac− X-gal（IPTGなし）ラクトース添加 弱くON	lac+ X-gal＋IPTG培地 強くON

※ IPTG 溶液の使用

IPTG がある場合には、ラクトースと同様 IPTG 溶液を希釈用チューブに添加し、全ての試料を IPTG を含まない lac−シートで培養することで、同様の結果が得られます。

IPTG は 0.1M（0.24g/10mL）のストック溶液を作っておき、実験時に菌希釈液 1mL に 10 μ L 加えます。

５．アンピシリンの使用について

「サニ太くん　高校生物実験教材用」は、大腸菌の形質転換の実験でも培地として使用することができます。菌をまく前に、希釈液にアンピシリンを加えておくことで、青白セレクション（サニ太くんでは「青赤」になる）を見ることが可能です。

アンピシリンはストック液を作っておき、滴下液（1mL）に 50 ～ 100 μ g　含まれるように、混合します。アンピシリン（5g　3500 円程度）の購入など、初期投資は必要ですが、高価なキットを買わなくても、市販の高速コンピテントセルを購入すれば、付属のコントロールプラスミドを使って、形質転換の実験が可能になります。

須磨東高等学校 HP で実験の概要と授業実践を紹介しています。

形質転換　実験結果例　　すべて X-gal と IPTG を含む lac+シートを使用

プラスミド添加なし		プラスミド添加	
アンピシリン添加なし （10^4 に希釈）	アンピシリン添加 （希釈せず懸濁液そのまま）		アンピシリン添加なし （10^4 に希釈）

使用コンピテントセル　　（有）サイトローブ　RH617　Value 108 HIT-DH5a

プラスミド　　pUC19

高校生物実験教材用！

SHEET MEDIUM

Sanita-kun

シート培地 サニ太くん®

JNC株式会社

ご注文は FAX または Email で

FAX : **(03)3243-6219**

Email :
sanita-kun@jnc-corp.co.jp

教材用サニ太くんはただいまモニター期間となっております。ご使用の際にはモニターアンケートへのご回答をよろしくお願いいたします。

モニター品ご注文納品先

学校名	
お名前	
Email	
所在地　〒	TEL： FAX：

シート培地　サニ太くん 高校生物実験教材用　ｌａｃ＋	TTC と X-gal および IPTG を含むシートです	1 袋 10 枚入り	袋
シート培地　サニ太くん 高校生物実験教材用　ｌａｃ－	TTC と X-gal を含み IPTG を含まないシートです	1 袋 10 枚入り	袋

モニター品につきお申し込みは各シート 1 校 5 袋までとさせていただきます。
授業クラス・生徒数により 5 袋では実習実施に不足する場合にはお申し込み時にメールにてご相談下さい。

実験準備に必要な場合には ラクトースオペロンを持つ 大腸菌 K12 株 を培養した「サニ太くんスタートシート」 を 1 枚お付けします	スタートシート 要　／　不要

スタートシートをご希望の場合には別紙誓約書に記入捺印の上、本申込フォームと共にお送り下さい。

本品は学校教材用に作製されたものです。食品衛生・環境等に関わる検査には検査用のサニ太くんをご使用下さい。また、必ず取扱説明書をご覧いただき、使用・保管・廃棄等の方法には十分ご注意下さい。

サニ太くんＨＰ　http://www.jnc-corp.co.jp/sanita/

生徒実験に関する詳しい資料や実践報告は兵庫県立須磨東高等学校ＨＰにて公開しています。（須磨東ＨＰ内「須磨東理科実験教材の広場」）

兵庫県立須磨東高等学校ＨＰ　http://www.hyogo-c.ed.jp/~sumahigashi-hs/

生徒実験内容に関するお問い合わせは須磨東高校 教諭 薄井 まで お願いいたします。

「サニ太くんスタートシート」の使用に関して

JNC 株式会社

「サニ太くんスタートシート」には、大腸菌（K-12）が生育しています。この大腸菌は、各種疾病を引き起こすような病原菌ではありませんが、生きた微生物を取り扱うこととなりますので、下記の事項についてご理解いただき十分注意して取り扱いいただきますようお願い致します。

記

1, 「サニ太くんスタートシート」を学校教育における実験目的以外には使用しないこと。

2, 第三者に不正に使用されないように「サニ太くんスタートシート」を適切に管理すること。

3, 生徒に実験で使用させる際には、微生物の取り扱いに関する基本事項（菌には直接触らない等）をあらかじめ生徒に教育すること。

4, 「サニ太くんスタートシート」を実験にて使用する場合は、取り扱い説明書にしたがい、自己の責任にて十分に注意して取り扱うこと。

5, 「サニ太くんスタートシート」の使用済み品あるいは余剰品を廃棄する場合は、必ず加熱滅菌処理を行うこと。

以上

＊上記注意事項についてご理解をいただければ、ご面倒ですが別紙「誓約書」に記載のうえ返送をお願いいたします。

送付先

〒100-8105　東京都千代田区大手町 2-2-1　新大手町ビル 9 階

JNC 株式会社　ライフケミカル推進室　担当　木村龍三

誓　約　書

JNC 株式会社
ライフケミカル推進室長　髙　﨑　真　一　行

1．当校は貴社から受領した『「サニ太くんスタートシート」使用に関して』に記載されている注意事項を十分に理解したうえで、当校の責任において以下の事項を遵守します。
①注意事項にしたがって適切にサニ太くんスタートシートを保管し、使用すること。
②注意事項にしたがって適切にサニ太くんスタートシートを使用するように、生徒を指導すること。
2．当校が前項に反した結果、万が一損害が発生した場合には、貴社が責任を負わないことに同意いたします。

年　　月　　日

学校名 （所属団体名）	
住所	〒
連絡先	TEL　　FAX E-mail
学校長名	印
担当者名	印

「サニ太くん」による大腸菌ラクトースオペロンの発現観察実験について

このたびは「サニ太くん　高校生物実験教材用」をご利用いただき、ありがとうございます。
ご使用いただいた先生方のご意見をお聞かせいただき、今後の参考にさせていただきます。
ご協力をよろしくお願い申し上げます。

＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿高等学校　＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿先 生

①サニ太くんをどのような場面で利用なさいましたか。
□通常授業の中での実験　□学期末など特別な時間設定で行う授業での実験
□課題研究や探究学習など通常授業とは別の取り組み
□部活動・クラブ活動　□その他（　　）

②対象の学年、生徒集団についてお書き下さい。
（　　）年　理系　／　文系　／　その他（　　）
実施クラス（講座）数（　　）　1 グループ（　　）名×（　　）グループ

③実験のテーマ
□大腸菌ラクトースオペロンの発現観察　□大腸菌の形質転換（*lacZ* 発現系）
□その他（　　）

④生徒 1 グループにつきサニ太くんを何枚ずつ使用しましたか。
・X-gal サニ太くん（　　）枚　・X-gal＋IPTG サニ太くん（　　）枚

⑤生徒実験前の教師の予備実験のためにサニ太くんを何枚使用しましたか。
・X-gal サニ太くん（　　）枚　・X-gal＋IPTG サニ太くん（　　）枚

⑥使用後のサニ太くん、スポイト、つまようじ、菌希釈液などの殺菌はどのように行いましたか。
□オートクレーブを使用した　□鍋で煮沸を行った
□塩素系漂白剤の液に浸した　□その他（　　）

⑦この実験の準備で入手が難しかったと感じたものがあれば、お書き下さい。

⑧生徒さん方はサニ太くんをスムーズに使用できていましたか。お気づきの点をお書き下さい。

⑨この教材についてのご意見をお聞かせ下さい。（価格についてのご意見もぜひお願いいたします。）

⑩申し込み方法、取扱説明書や実験プラン説明書などについてお気づきの点をお書き下さい。

ご協力をありがとうございました。
ご回答は　FAX : (03)3243-6219 または　Email : sanita-kun@jnc-corp.co.jp　で返送をお願いいたします。